

**ANALISIS KUANTITATIF TABLET LEVOFLOKSASIN MERK DAN GENERIK DALAM PLASMA
MANUSIA SECARA *IN VITRO* DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET-
VISIBEL**

Nur Ida Dwi Retnani*, Pri Iswati Utami*, Didik Setiawan*

*Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuhwaluh,
PO Box 202, Purwokerto 53182*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian validasi metode spektrofotometri Ultraviolet-Visibel (UV-Vis) untuk analisis kuantitatif tablet levofloksasin generik dan merk dalam plasma manusia secara *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menetapkan kadar Levofloksasin dalam plasma secara *in vitro* dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dan mengetahui validasi metodenya. Validasi metode analisis meliputi linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, ketelitian dan kecermatan. Panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 295,2 nm. Hasil uji linearitas menunjukkan nilai $r = 0,9936$ (r hitung $> r$ tabel = 0,878), batas deteksi (0,2256 $\mu\text{g/mL}$), batas kuantitasi (0,75 $\mu\text{g/mL}$), uji ketelitian 4,871%, kecermatan untuk penambahan levofloksasin baku 10 dan 15 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam larutan sampel merk (82,06% dan 91,47%) dan sampel generik (87,23% dan 104,88%). Hasil penetapan kadar levofloksasin dalam plasma secara *in vitro* diperoleh rata-rata kadar levofloksasin untuk produk generik dan bermerk berturut-turut sebesar $102,68 \pm 3,02$ dan $138,53 \pm 5,82$ %. Dari uji-t diperoleh hasil t hitung $> t$ tabel yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar levofloksasin generik dan merk.

Kata kunci: levofloksasin, validasi metode, Spektrofotometri UV-Vis, plasma, *in vitro*.

Abstract

Had been Validation of Quantitative Analysed Method of Levofloxacin Generic and Branded Tablet in plasma by In vitro with Spectrophotometry UV-Vis. The perpose of this research is determination of levofloxacin tablet in plasma by in vitro with Spectrophotometry UV-Vis and to know how this validation method. Validation of analys method such as linearity, LOD, LOQ, precision, and accuration. Beer's law is obeyed at λ max 295.2 nm. The result of linearity assay is $r = 0.9936$ (r count $> r$ tab = 0.878), limit of detection 0.22 $\mu\text{g/mL}$, limit of quantitation 0.75 $\mu\text{g/mL}$, precision 4.871%, accuration with addition of levofloxacin standard 10 and 15 $\mu\text{g/mL}$ in to branded sample solution (82.06% and 91.47%) and generic (87.23% and 104.88%). Determination result of

levofloxacin tablet in plasma was obtained for generic and branded products were 102.68 ± 3.02 and 138.53 ± 5.82 % respectively. t-test result was obtained that $t_{count} > t_{table}$, that mean there is a significant different between levofloxacin content in generic and branded.

Keywords: Levofloxacin, UV-VIS Spectrophotometry, Plasma, In vitro

Pendahuluan

Belakangan ini produk levofloksasin sudah banyak beredar di pasaran baik merk maupun generik yang merupakan produk *copy* dari inovator atau bentuk patennya. Suatu produk *copy* harus memiliki kesamaan khasiat, keamanan, dan mutu jika dibanding dengan inovatornya. Oleh karena itu produk tersebut memerlukan standar mutu yang berupa bioavailabilitas dan bioekivalensi sebanding dengan inovatornya sebagai produk pembanding (*reference product*).

Uji bioavailabilitas dan bioekivalensi mempunyai serangkaian proses yang panjang. Validasi metode analisis yang merupakan tahap awal dari uji bioavailabilitas dan bioekivalensi, dan penetapan kadar secara *in vitro* dalam plasma.

Penetapan kadar levofloksasin dalam plasma dilakukan terhadap sampel merk dan generik dengan maksud untuk membandingkan kadar

keduanya. Selama ini telah dilakukan penelitian terhadap tablet levofloksasin. Diantaranya berupa validasi metode dan analisis levofloksasin secara *in vitro* dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) oleh Sundari & Suswati (2007). Namun metode ini membutuhkan biaya yang tinggi baik untuk perlengkapan maupun pelarut yang dibutuhkan. Analisis kuantitatif levofloksasin dalam plasma secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri UV belum dilakukan. Metode ini memberikan cara yang sederhana untuk menetapkan jumlah zat yang sangat kecil dan dengan biaya yang tidak mahal untuk suatu analisis kimia (Basset, *et al.*, 1994).

Metode Penelitian

Bahan: tablet levofloksasin generik no. *batch* 0811019 dan baku pembanding levofloksasin (PT.Indofarma), tablet levofloksasin merk (PT.Kalbe Farma) no. *batch* 121082, aquabidestilata (Otsuka), EDTA

(Merck), Asam trikloro aasetat (TCA) 10%, plasma manusia.

Alat: spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu 1601), neraca analitik (Shimadzu AUY 220), sentrifugator, vortex, mikropipet, *stopwacth* dan alat-alat gelas yang dipakai dalam laboratorium kimia anilisis.

Cara Kerja

1. Pembuatan Berbagai Larutan

- a. Larutan stok levofloksasin baku
100 $\mu\text{g/mL}$: 10 mg baku levofloksasin dilarutkan dalam 100 mL aquabidestilata.
- b. Penyiapan plasma: Darah manusia diambil dari vena ditambah dengan antikoagulan (EDTA). Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya untuk analisis sampel plasma.

2. Penentuan λ maks dan *Operating time*

Larutan levofloksasin 20 $\mu\text{g/mL}$ diambil 1 mL, ditambah 0,5 mL plasma. Campuran tersebut divorteks selama 3-5 detik lalu ditambahkan TCA 10 % sebanyak 2,5 mL. Setelah itu, disentrifugasi

dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit (Clevelandclinic, 2007). Filtrat jernih diambil dan serapannya dibaca pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang dengan serapan terbesar merupakan λ maks. Untuk penentuan *operating time* maka filtrat jernih dibaca serapannya pada λ maks pada menit ke 3, 5, 7, 10, 15 untuk menentukan *operating time*-nya

3. Validasi Metode Analisis

a. Pembuatan kurva baku

Larutan stok 100 $\mu\text{g/mL}$ dipipet sebanyak 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2; 2,4 mL diencerkan sampai 10 mL dengan aquabidestilata. Masing-masing 1 mL larutan tersebut ditambah dengan 0,5 mL plasma. Kemudian divorteks 3-5 detik. TCA 10% ditambahkan sebanyak 2,5 mL dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Diperoleh filtrat jernih dengan konsentrasi levofloksasin 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 $\mu\text{g/mL}$ dan masing-masing dibaca serapannya pada λ maks. Dibuat persamaan kurva hubungan antara serapan dan konsentrasi levofloksasin

serta dihitung koefisien korelasinya.

b. Penentuan LOD dan LOQ

Untuk menentukan LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui persamaan garis linier dari kurva baku (Harmita, 2004). Berdasarkan nilai intersep dan kemiringan dari persamaan kurva baku dapat diketahui LOD dan LOQ dari penetapan kadar levofloksasin menggunakan metode Spektrofotometri. Perhitungan LOD dan LOQ menggunakan rumus sebagai berikut :

$$S_{y/x} = \left\{ \sum (Y_i - \hat{Y})^2 / (n-2) \right\}^{1/2}$$

$$S_a = S_{y/x} \left\{ \sum X_i^2 / n \sum (X_i - \bar{X})^2 \right\}^{1/2}$$

$$a = Y_b$$

$$S_a = S_b$$

$$\text{LOD} = Y_b + 3 S_b$$

$$\text{LOQ} = Y_b + 10 S_b$$

(Miller & Miller, 1991)

c. Uji presisi

Disiapkan 6 larutan levofloksasin 5 µg/mL dalam plasma, masing-masing dibaca serapannya pada

panjang gelombang maksimum.

d. Uji akurasi

Dilakukan dengan metode adisi secara triplo yaitu 0,5 mL plasma disiapkan dalam 3 tabung. Tabung I tanpa penambahan baku levofloksasin, tabung II ditambah 1 mL baku levofloksasin konsentrasi 10 µg/mL, sedangkan tabung III ditambah 1 mL baku levofloksasin konsentrasi 15 µg/mL. Ketiga tabung mengalami perlakuan yang sama, yaitu ditambah 1 mL larutan sampel levofloksasin 10 µg/mL, divorteks selama 3-5 detik dan ditambahkan TCA 10% sebanyak 2,5 mL. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Filtrat jernih yang diperoleh dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi digunakan untuk menghitung nilai perolehan kembali (*recovery*).

Recovery dihitung dengan membandingkan jumlah levofloksasin baku terukur terhadap jumlah baku teoritis.

$$Recovery = \left\{ \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar teoritis}} \right\} \times 100\%$$

4. Penetapan Kadar Levofloksasin

Sebanyak 10 tablet levofloksasin generik yang memenuhi keseragaman bobot tablet digerus hingga halus dan homogen. Serbuk ditimbang secara seksama sejumlah tertentu yang setara dengan 10 mg levofloksasin, dilarutkan dalam aquabidestilata hingga 100 mL. Satu mililiter larutan stok tersebut diencerkan hingga 10 mL. Diambil 1 mL dan ditambah dengan 0,5 mL plasma. Larutan divorteks selama 3-5 detik. Kemudian ditambah TCA 10% sebanyak 5 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Filtrat jernih dipisahkan untuk diukur serapannya pada λ maks. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap tablet levofloksasin merk. Hasil kadar yang diperoleh dianalisis dengan uji t untuk mengetahui ada tidaknya

perbedaan kadar yang dihasilkan dari kedua sampel.

Hasil dan Pembahasan

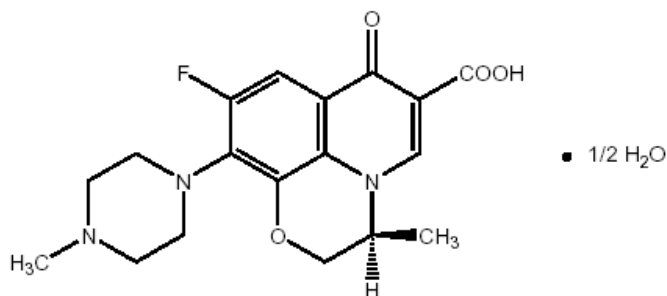
Penelitian validasi metode analisis kuantitatif tablet levofloksasin merk dan generik dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri UV-Vis bertujuan untuk mengetahui cara penetapan kadar tablet levofloksasin merk dan generik dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri UV-VIS beserta proses validasinya. Validasi dilakukan untuk menguji suatu metode sebelum digunakan untuk penelitian selanjutnya agar sesuai syarat penggunaannya. Penetapan kadar tablet levofloksasin generik dan merk dilakukan sebagai langkah untuk membandingkan kualitas keduanya, dimana kualitas suatu obat ditunjukkan dengan efektifitas farmakologinya.

Analisis kuantitatif suatu obat dalam cairan biologis membutuhkan metode dengan selektifitas dan sensitivitas yang tinggi serta memiliki pengganggu sesedikit mungkin. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis ini adalah metode

spektrofotometri UV-Vis. Metode ini memiliki keuntungan utama yaitu memberikan cara sederhana untuk menetapkan jumlah zat yang sangat kecil dan dengan biaya yang tidak mahal untuk suatu analisis kimia (Basset *et al.*, 1994).

Metode Spektrofotometri UV-Vis dipakai untuk analisis terhadap molekul-molekul yang strukturnya ada ikatan rangkap terkonjugasi atau mengandung kromofor dan aoksokrom (Mulya & Suharman, 1995). Kromofor merupakan gugus tak jenuh kovalen

yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah ultraviolet dan terlihat, sedangkan aoksokrom adalah gugus jenuh yang bila terikat pada gugus kromofor mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum. Ciri aoksokrom adalah yang langsung terikat pada kromofor, misal: -OCH₃, -Cl, -OH, NH₂ (Sastrohamidjojo, H., 2007). Levofloksasin merupakan senyawa yang memiliki gugus kromofor dan aoksokrom yang mampu menyerap energi sehingga dapat ditetapkan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis.



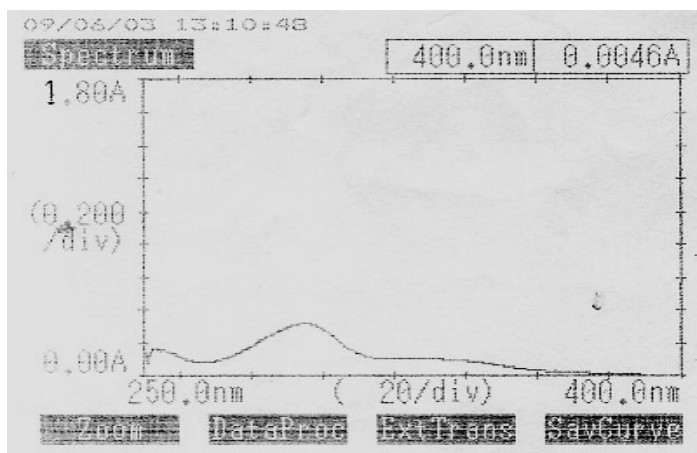
Gambar 1. Struktur levofloksasin (Davani dan Puderbaugh, 2008)

Validasi Metode Analisis Levofloksasin dalam Plasma

a. Linearitas (*Linearity*)

Persamaan garis yang diperoleh dari perhitungan statistik adalah $y = 0,05757x + 0,05158$ dengan

koefisien korelasi (r) 0,9936. Nilai (r) bisa diterima karena (r) tabel untuk derajat bebas (db) 3 dengan taraf kepercayaan 95% < (r) hitung yaitu $0,878 < 0,9936$ sehingga memenuhi uji linearitas.



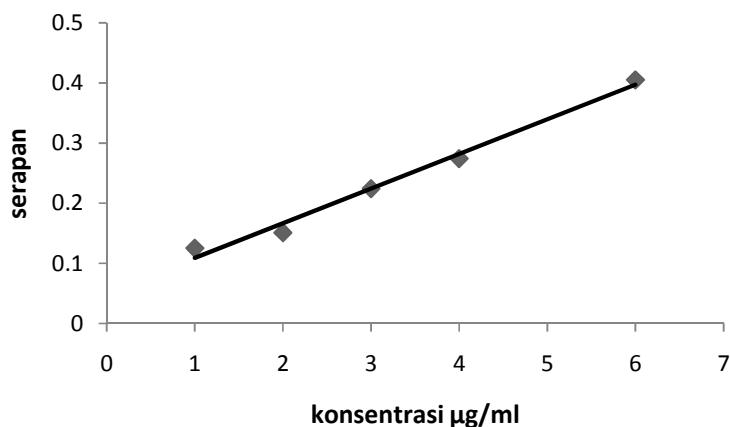
Gambar 2. Hasil spektrum λ maksimum larutan levofloksasin 5 $\mu\text{g/ml}$ dalam plasma

b. LOD dan LOQ

Berdasarkan perhitungan statistik dari kurva baku, didapatkan nilai LOD dan LOQ berturut-turut

sebesar 0,2256 dan 0,7519 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil uji linearitas dan LOD serta LOQ tersebut menunjukkan bahwa metode ini cukup sensitif.



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi levofloksasin ($\mu\text{g/mL}$) dan serapan

c. Ketelitian (*precision*)

Dari hasil perhitungan didapatkan koefisien variasi (KV) sebesar 4,871 %. Menurut *Washington Conference Report on Bio Analytical Method Validation*, untuk bioanalisis %KV = 15-20% masih dapat diterima (Mulja & Hanwar, 2003). Berdasarkan syarat tersebut menunjukkan hasil yang diperoleh masih memenuhi persyaratan sehingga dapat dikatakan metode memiliki ketelitian yang tinggi.

d. Ketepatan (*Accuracy*)

Akurasi atau ketepatan merupakan ukuran kedekatan hasil analisis yang diperoleh dengan metode tersebut dengan nilai yang sebenarnya (Mulja & Suharman, 1995). Pada uji ketepatan digunakan metode adisi atau penambahan baku standar, dimana sejumlah tertentu analit yang yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi (Harmita, 2004). Digunakannya metode ini disebabkan matrik sampel tidak diketahui sehingga sulit menggunakan metode plasebo. Hasil uji *recovery* berkisar antara 82,2-104,88%. Dari data

tersebut dapat dilihat bahwa % *recovery* yang dihasilkan masih memenuhi persyaratan ketepatan metode yaitu 80-120% (Harmita, 2004). Dapat dinyatakan bahwa metode ini memiliki ketepatan yang baik ditunjukkan dengan adanya kedekatan antara nilai kadar yang dihasilkan dengan kadar yang sebenarnya.

Penetapan Kadar Levofloksasin dalam Plasma secara *In Vitro*

Dari hasil uji keseragaman bobot diperoleh penyimpangan bobot berkisar antara 0,109-4,878 %. Dari hasil tersebut dapat dikatakan keseragaman bobotnya baik dan dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar tablet levofloksasin.

Hasil penetapan kadar levofloksasin dalam plasma secara *in vitro* diperoleh rata-rata kadar levofloksasin untuk produk generik dan bermerk berturut-turut sebesar $102,68 \pm 3,02$ dan $138,53 \pm 5,82$ %. Persen kadar yang diperoleh dari kedua sampel jika dibandingkan dengan ketentuan yang ada pada draft USP mengenai kandungan levofloksasin sebesar 98-102%, maka persen kadar untuk sampel

generik masih memenuhi ketentuan tersebut, tetapi untuk sampel merk hasilnya di atas ketentuan. Hal ini dapat disebabkan karena adanya kesalahan pada saat pembacaan atau pengamatan instrumen, karena peralatan yang tidak dikalibrasi secara berkala, atau karena kadar yang terdapat dalam sampel tablet merk tidak memenuhi persyaratan, mengingat validasi metode yang dihasilkan sudah valid.

Kesimpulan

Metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan memiliki nilai akurasi, presisi dan sensitivitas yang baik, dengan batas deteksi dan batas kuantitasi berturut-turut sebesar 0,2256 dan 0,7519 $\mu\text{g/mL}$. Penetapan kadar levofloksasin dalam plasma secara *in vitro* dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis yang sudah divalidasi.

Daftar Pustaka

- Basset, J., Denny, R.C., Jeffrey, G.H., Mendham, J. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. (Terjemahan). Pudjaatmaja, A.H., Setiono. L. Edisi Keempat. Jakarta; EGC. Hlm 810.
- Clevelandclinic. 2007. *Blood Specimen Collection, Handling, and Transportation*. <http://referencelab.clevelandclinic.org/SpecimenCollection.htm>. p.3. [20 Desember 2008].
- Davani MD-AA: B. dan Puderbaugh M.2008. *Draft USP Pending Standard 'Levofloxacin'*. USP's Pending Standards Guideline. <http://www.usp.org>. [20 desember 2008]
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian Vol. 1, No. 3: 117-134. Jakarta: FMIPA UI
- Miller, J., dan Miller, J.N. 1991. *Statistika untuk Kimia Analitik* (Terjemahan). Suroso. Bandung: ITB. Hlm 115-116;122.
- Sundari, I. 2007. *Validasi Metode Penetapan Kadar Levofloksasin Merk Dalam Plasma Secara Invivo Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Purwokerto: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto.